Feel so Science キットシリーズ

#005 DNA 結合キット

取扱説明書

1-100-005

目次

本キットの特徴

本キットは、遺伝子工学において最も重要な働きを持つ酵素のひとつ、「DNA 結合酵素」について学ぶキットです。

DNA 結合酵素（DNA リガーゼ）は、DNA 断片同士を結合させる働きを持つ酵素です。本キットでは、この DNA 結合酵素を用い、制限酵素で処理されたラムダファージ DNA 断片を結合する実験を行い、その結果を電気泳動法によって確かめます。

本キットは、 Feel so Science キットシリーズ＃004「制限酵素キット」とセットで実験を行うことにより、現在の遺伝子工学で中心的な技術となっている遺伝子のクローニング技術について学習することが可能です。

キット使用時に必要な試薬機材の一覧

キット内容 【生徒 20 名（4 人 1 班、5 班）分】

・DNA 断片溶液	110 µl
・DNA リガーゼ	20 µl
・ライゲーションバッファー	20 µl
・精製水	20 µl
・ローディングバッファー	110 µl
・DNA マーカー	60 µl
・40 倍濃縮電気泳動バッファー	25 ml
・アガロース	2 g
・マイクロチューブ	20 本
・取扱説明書(本書)	1 冊

本キット以外に必要な試薬・機材一覧

・精製水	975 ml
・氷	500 g 程度
・マイクロピペット 20 µl 用	5 本（各班 1 本）
・マイクロピペット用チップ	5 箱（各班 1 箱）
・電気泳動槽	1～2 個
ミニゲルを 2 個泳動できる個数をご用意下さい。	
・蛍光観察フィルム（黄色）	
・青色 LED ライト	
・フロート	5 個（各班 1 個）

※機材につきましては弊社で販売およびレンタル(有料)を行っております。ご入用の際にはお問合せください。

内容物について

DNA 断片溶液

ラムダ･ファージ由来の DNA を *Haemophilus influenzae* Rd.由来の制限酵素 *Hin*d III で切断した DNA 溶液です。DNA の分解を防ぐ目的で TE バッファーに溶解してあります。-20 °C にて保存し、使用前に氷上で融解させてください。

DNA リガーゼ

T4 ファージ由来の、DNA 断片を結合する活性を持つ酵素です。酵素は常温では短時間で失活しますので、**必ず-20 °C にて保存してください**。使用時には必ず氷上に置き、チューブを温めないようにご注意ください。本酵素は、室温（16～26 °C）で高い活性を示します。

10×ライゲーションバッファー

DNA リガーゼが最も高い DNA 結合活性を発揮するように調製されたバッファーです。本バッファーは DNA リガーゼが働くために必要な ATP を含んでいます。-20 °C にて保存してください。

精製水

DNA 分解酵素および RNA 分解酵素が含まれていない精製水です。-20 °C にて保存してください。

DNA マーカー

ラムダ･ファージの DNA を、あらかじめ *Hin*d III と *Eco*R I という制限酵素で処理し、複数の断片に切断したものです。生じる DNA 断片の長さは既知であるため、これらの断片はサンプル DNA の長さを推定する目安となります。-20 °C にて保存し、使用前に氷上で融解させてください。

アガロース

核酸、タンパク質などの生体高分子を完全に除去した精製アガロースです。高温多湿をさけ、常温にて保存してください。

ローディングバッファー

DNA サンプルを電気泳動する際に使用します。-20 ℃ にて保存し、使用前に氷上で融解させてください。色素を含み、衣服につくと落ちにくいので、取り扱いには十分にご注意ください。

また、このローディングバッファーには泳動後の DNA 観察のための DNA 染色試薬が含まれています。蛍光色素ですので、できれば暗所にて保存をしてください。

40 倍濃縮電気泳動バッファー

40 倍の濃度に濃縮した TAE（トリス-酢酸-EDTA）バッファーです。アガロースゲルの作成および、DNA サンプルをアガロースゲル電気泳動法により分離する際の泳動バッファーとして使用します。4℃にて保管してください。電気泳動用バッファーとして使用の際は、精製水で 40 倍に希釈してご使用ください。

事前準備

班構成

本キットでは 4 人 1 班(実験は 2 人 1 組)を推奨しています。

1 班分の機材・試薬

DNA 結合実験

DNA 断片溶液	20 μl
リガーゼ	3 μl
リガーゼバッファー	3 μl
精製水	3 μl
マイクロピペット 20 μl 用	1 本
マイクロピペット用チップ	1 箱
空のマイクロチューブ	2 本

電気泳動実験

ローディングバッファー	18 μl
DNA マーカー	10 μl
マイクロピペット 20 μl 用	1 本
マイクロピペット用チップ	1 箱

全体で用意するもの

40 倍濃縮電気泳動バッファー	300 ml ※(40 倍希釈後)
電気泳動槽	1~2 台
アガロースゲル(17 穴)	1 枚
ビニール手袋	適量(班に 1 セット)

DNA 結合実験の準備

1) 試薬の準備

試薬をマイクロチューブに所定の量に分けたものを、班数分を用意します。内容物が微量なため、マイクロチューブの蓋についていることがございます。その際には、手で振ってマイクロチューブの底に溶液を集めてからご使用ください。試薬は実験直前まで 4 °C にて保管してください。

電気泳動実験の準備

1) 電気泳動（1×TAE）バッファーの作成

40 倍濃縮泳動バッファー25 ml を 975 ml の水で 40 倍に希釈します。本キットで使用を推奨している電気泳動槽 Mupid-2 Plus では、電気泳動バッファーを約 300 ml/台（ゲルが浸る程度） 使用します。

2) アガロースゲルの作製

a. 300 ml の三角フラスコに 1.4 g のアガロースを入れ 1）で作成した電気泳動バッファー200 ml を加えよく混ぜます。三角フラスコの口をラップで閉じ電子レンジで加熱してアガロースを完全に融解させます。この作業はアガロースの粒子が見えなくなるまで行ってください。加熱の際は、沸騰による噴出に注意してください。なお、この作業は水蒸気によるやけどの危険性がありますので、必ず指導者が行なってください。なお、軍手の上にビニール手袋をして作業を行うことで火傷の危険性を下げることが出来ます。

b. 溶解させたアガロースは、電気泳動槽付属のゲルメーカーを用いて成型します。a.で融解したアガロースを、50 °C 程度まで冷ました後、ゲルメーカーに流し込み、上からウェルを作製するためのコームを差し込みます。アガロースが固まるまで上からアルミホイルで覆い、静置してください。

※ゲルトレイの低い方の壁の 2/3 程度の高さを目安としてゲルを流し込みます。

※ 200 ml のアガロース溶液で、小さいゲルが約 8 枚、大きなゲルでは 4 枚

作製できます。ゲルメーカーが 1 個しかない場合で、小さいゲルを 4 枚以上作製したいときには、a.のステップで、0.7 g のアガロースを 100 ml の電気泳動バッファーに溶かすなどして、小分けにゲル作製を行ってください。電気泳動槽 1 台で行う場合は、17 ウェルのゲルを 1 枚作成し、1 班 3 ウェルずつ使用します。また、一度固まってしまったゲルでも、再度温めることで溶解し、ゲルを作製することが可能です。

作製したアガロースゲルは、希釈後の電気泳動バッファーに浸した状態で 1 ヶ月程度常温保存が可能です。また、使用前にはウェルの底に穴が開いていないことを目視で確認してください。

3) 試薬の準備

マイクロピペットを使って、DNA マーカー溶液を 10 µl、ローディングバッファーを 18 µl ずつマイクロチューブに分けます。

実験手順

DNA 結合実験の手順

1) 氷上で DNA 断片溶液、10×ライゲーションバッファー、精製水を融解させます。

2) マイクロチューブに、10×ライゲーションバッファー 1 μl、DNA 断片溶液 8 μl を入れ、マイクロピペットで均一に混ぜあわせます。この混合溶液を各班につき、2 本ずつ作成し、マイクロチューブの蓋に一方は「+」他方には「-」と油性ペンで記入します。

3) 2)で作成した混合溶液を氷上で 5 分間、静置してください。

4) 各班2本のマイクロチューブ「+」にはDNAリガーゼを1 μl 加え、「-」には精製水 1 μl 加えてください(※)。それぞれの混合溶液はマイクロピペットで均一になるよう混ぜあわせてください（**注：DNAリガーゼの入ったマイクロチューブは必ず氷上に置いて作業してください。使用後は速やかに-20 ℃ へ移動してください**）。

5) 氷上から室温にマイクロチューブを移し、室温（16～25 **℃**）で 30 分間静置してください（注：最適な温度は 16 ℃ ですが、室温でも酵素反応は可能です）。

※ DNAリガーゼを加えないサンプルを調整することで、DNAリガーゼの活性を確かめることができます。DNA リガーゼは 10 反応分用意してありますので、両方のチューブにリガーゼを加えることも可能です。

電気泳動実験の手順

1) 電気泳動槽の準備

電気泳動槽に電気泳動バッファーを加え、電気泳動槽内のマイナス極側にウェル(穴)が来るようにアガロースゲルをセットします。アガロースゲルが電極と平行になるようにセットしてください。使用する電気泳動バッファーの量は、電気泳動槽によって異なりますので、電気泳動槽の取扱説明書に従い、適切な量をご使用ください(参考:Mupid-2Plus では約 300 ml 程度)。

2) DNA サンプルの調製

本キット添付のローディングバッファーを 3μl ずつ反応の終了した DNA サンプルに加えよく混ぜます(合計 12 μl)。DNA マーカーにも 3μl のローディングバッファーを加えてよく混ぜてください。

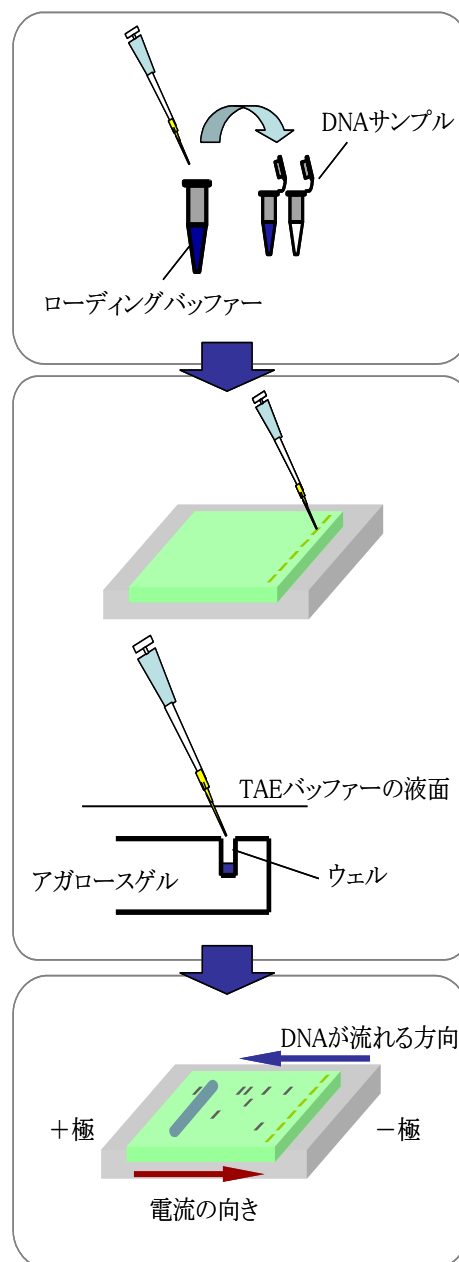
3) DNA サンプルの注入(アプライ)

DNA サンプルを別々のウェルにアプライします。アプライは、右図のようにチップの先をウェル内まで入れないようにします。チップの先端でウェルを破壊しないよう、細心の注意を払ってください。

4) アガロースゲル電気泳動

電気泳動槽の電源スイッチを入れ、電気泳動を開始します。DNA はプラス極側に移動します。くれぐれも感電にご注意ください(参考:Mupid-2 Plus での電気泳動条件は 100 ボルトで 20 分程度)

5) アガロースゲルでの DNA 観察

p19 の「付録 5 DNA 観察の推奨方法」をご覧ください。

ポイント

DNA 結合実験

1) DNA リガーゼは失活しやすいので、マイクロチューブを持つ際に手で試薬を温めないように注意して下さい。また、DNA リガーゼが入ったチューブに強い衝撃を与えないようにして下さい。

2) 少量の溶液を扱うので、マイクロピペットで吸った際にきちんと試薬が取れているかどうかを目で確認するようにして下さい。

3) DNA 溶液、DNA リガーゼ、バッファーなどを反応用チューブに入れたあと、しっかりと混合して下さい。混合の手段として、片方の手でチューブの上の方を持ち、もう一方の手の指で軽く数回チューブの先端をはじくタッピングや、マイクロピペットで溶液を何度か出し入れするピペッティングなどがあります。

電気泳動実験

1) DNA を注入するためのウェルは非常に小さいため、初めて電気泳動を行う場合は、マイクロピペットのチップを刺してゲルに穴を開けてしまったり、うまく DNA サンプルを入れられずに失敗する可能性があります。ゲルを多めに作っておき、実験前に手で触って固さを確かめさせたり、水で希釈したローディングバッファーを使って注入の練習をするといいでしょう。

2) アガロースゲルはもろく割れやすいため、扱いには注意が必要です。特に染色時はゲルトレイから外す必要があるので、慎重に扱う必要があります。固めのクリアファイルなどを適当な大きさに切り、ゲルすくいとして利用することもできます。

4) 試薬が目や口に入った場合は水でよくすすぎ、気分が悪くなった場合は医師に相談してください。

片付け

1) 余った試薬類は、普通ゴミとして廃棄可能です。

2) 使用したチップやチューブはそのまま廃棄するとゴミ袋が破れてしまう可能性があるので、2 重にした小さな袋などにまとめて、プラスチックゴミとして廃棄して下さい。

3) 使用済みの電気泳動バッファーは、水道に流して捨てることができます。

4) 使用後のアガロースゲルは、袋などに密封して可燃ゴミとして廃棄できます。

付録 1　DNA リガーゼについて

DNA のハサミとノリ

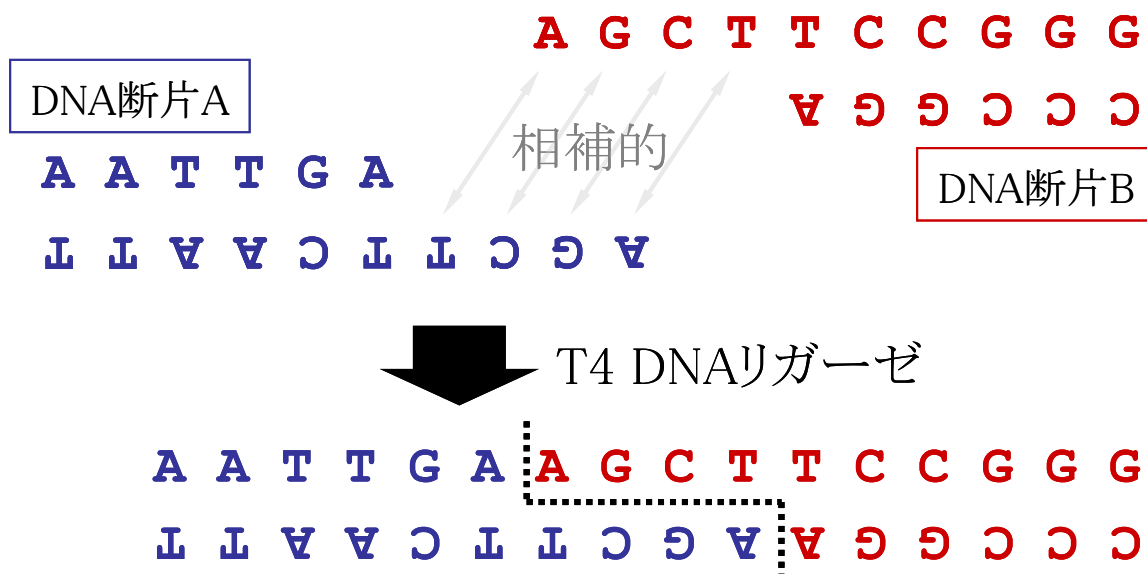
　DNA 配列を自らの考えたとおりにデザインする技術は、現在のバイオテクノロジーにとって不可欠な技術となっています。この技術の根幹を支えている反応は、DNA を切断する酵素、および DNA を連結する酵素です。これらの反応は、遺伝子のクローニング技術の中で最も基礎的な重要な反応であり、この反応を利用することにバイオテクノロジーは急速な発展を遂げました。

　このうち DNA を切断する「ハサミ」として働く酵素は制限酵素であり（#004 DNA 切断キット）、DNA を連結する「ノリ」として働く酵素が DNA リガーゼです。本キットでは、DNA リガーゼの働きについて学習することが可能です。

DNA リガーゼ　（DNA ligase）

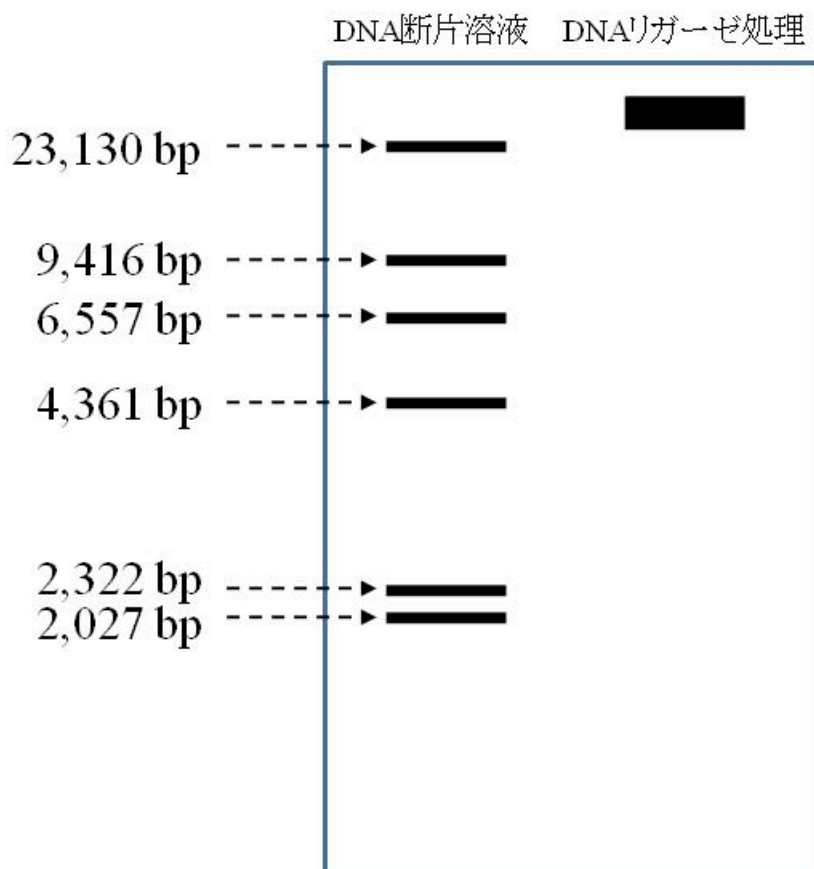
　本キットで使用する DNA リガーゼは、組換え大腸菌株由来の T4 DNA リガーゼです。T4 DNA リガーゼは、1 本鎖 DNA として突出した末端配列が相補的（A-T、 G-C の組み合わせ）な DNA 断片同士を連結する活性を持っています。下図は、制限酵素 *Hin*d III によって切断された DNA 断片が T4 DNA リガーゼによって連結する模式図を示しています。DNA 断片 A（青字）および DNA 断片 B（赤字）の突出末端部位は、互いに相補的な配列になっています。これらの断片が、T4 DNA ligase の働きにより 1 本の DNA 断片に連結されます。

A G C T T C C G G G
A G G C C C
DNA断片A
相補的
DNA断片B
A A T T G A
T T A A C T T C G A

A A T T G A A G C T T C C G G G
T T A A C T T C G A A G G C C C

付録 2　予想されるバンド像

***Hind* III はラムダ DNA を 7 箇所で切断する**

*Hin*d III はラムダ DNA の中にある AAGCTT という配列を認識し切断します。このような DNA 配列はラムダ DNA の中に 7 箇所存在しています。つまり *Hin*d III による切断後には 8 本の DNA 断片が存在することになりますが、アガロースゲル電気泳動法では、これらのうち 6 本のバンドについて目で確認することができます（2 本については DNA 断片が短いため、0.7 %アガロースゲルを用いた電気泳動での確認は難しくなっています）。

リガーゼはこの 8 つの断片をくっつける働きがあります。結合する順番までは指定できないため、様々な長さの DNA 断片が現れるはずです。その中で、ある程度濃度が高いものが、染色後に観察できます。

付録 3　電気泳動法の原理

アガロースゲル電気泳動法とは？

アガロースゲル電気泳動法は、DNA や RNA などの核酸をそれらの電気的な性質を利用して分離する方法です。核酸は「マイナス」の電荷を帯びているため、電場に置かれると、アガロース（※）のゲルの網目構造内(ゲルマトリックス)を＋極側に移動します。アガロースゲル電気泳動法では、長い DNA 断片はゲルマトリックス内をゆっくりと（引っかかりながら）動くのに対して、短い DNA 断片はより速く（あまり引っかからずに）動くことから、DNA 断片を長さによって分離することが可能です。この方法はバイオテクノロジーの研究において DNA 断片の精製の際に用いられる最もポピュラーな方法であり、現在のバイオテクノロジーを支える基本的な技術です。

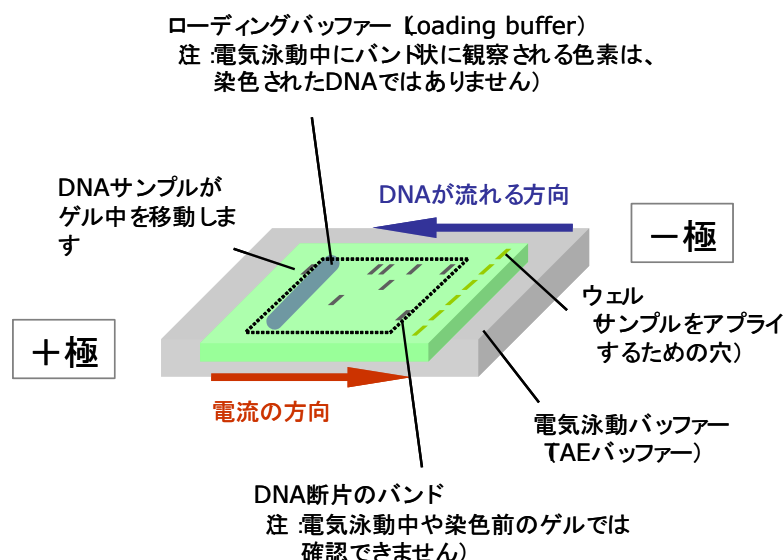
※アガロースとは？

アガロースは、「寒天」の主要な成分です。2 種類の糖が結合しあって網目状の構造をとることから、生体高分子、特に DNA を分離する際によく利用されます。

DNA の電気的性質

DNA は、リン酸基・塩基・デオキシリボース（糖の一種）によってできる「ヌクレオチド」とよばれる分子が直鎖状につながった構造をとっています。このうちリン酸基と塩基が荷電しています。

DNA の場合、塩基の荷電は二重鎖構造をとるために打ち消されているので、水溶液中ではリン酸基のみが荷電しており、したがって DNA はヌクレオチド数、すなわち分子量（※）に比例したマイナスの電荷を持っていることになります。

※DNA はヌクレオチドが直鎖状につながった構造をとるため、分子量はそのヌクレオチド数に比例します（塩基の種類によって多少の誤差が生じます）。一般的に DNA の大きさは分子量で表さずヌクレオチドの長さ（塩基対数、base pair：bp）で表します。

上図は、アガロースゲル電気泳動法の模式図を示しています。アガロースゲル電気泳動を行う際には、サブマリン型電気泳動槽とよばれる機器を使用します。まず電気泳動槽を、導電性でかつ DNA の分解が起こりにくい電気泳動バッファーで満たし、その中にアガロースゲルを静置します。アガロースゲルには、ウェルとよばれるサンプルをアプライするための穴があり、マイクロピペットを用いてここに DNA サンプルをアプライします。

DNA サンプルを電気泳動する際には、あらかじめ DNA サンプルをローディングバッファーと混和します。これにより DNA サンプルは、泳動バッファー中に拡散することなく、ウェル内にアプライすることが可能となります。ローディングバッファーには、電気泳動中にサンプルの移動度の目安となる色素や、ウェルに DNA サンプルを沈ませるためのグリセロールなどが含まれています。

あらかじめ DNA 断片のサイズの分かっている DNA マーカーを「DNA のモノサシ」として隣のレーンに電気泳動することで、未知のサンプルの分子量を検討することも可能です。

電気泳動の終了後は、DNA 断片を可視化するために染色します。DNA 染色に用いられる試薬としては、エチジウムブロマイド（EtBr）、Mupid Blue などが挙げられます。EtBr は検出感度に優れていますが、DNA の 2 本鎖の間に入り込む（インターカレーションする）物質であり、

発がん性が認められます。また、DNA 断片のバンドの観察の際に紫外線ランプが必要となるため、ビニール手袋を必ず着用し、防護メガネを使用するなど、取扱いには十分な注意が必要です。本キットでは、安全な Mupid Blue の DNA 染色液の使用を推奨します。

電気泳動バッファー

DNA の電気泳動では、一般に TAE バッファーや TBE バッファーが用いられます。TAE バッファーは数千 bp 以上の比較的長い DNA 断片の分離に適しているのに対して、TBE バッファーはそれよりも短い DNA の分離に適しています。

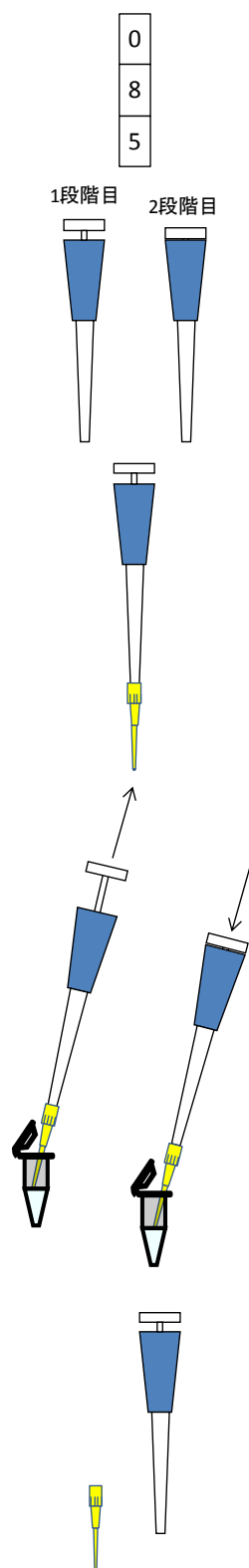
アガロースゲルの濃度

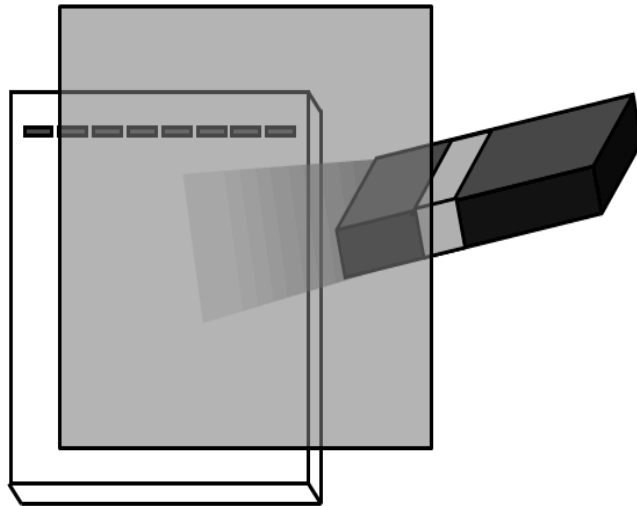
電気泳動法による DNA の分離実験では、ゲルの作成の際のアガロースの濃度が非常に重要となります。アガロースの濃度が上がれば上がるほどゲルマトリックス分子と DNA 断片の相互作用は強くなり DNA 断片の移動度が小さくなるため、より細かい DNA 断片の分離が可能となります。分離したい DNA 断片の長さによって適当なアガロース濃度を選択することが大切です。本キットでは、0.7 %のアガロースゲルを使用することを推奨しています。

アガロース濃度（%）	分離できる DNA 断片の長さ（bp）
0.6	1,000~20,000
0.7	800~10,000
1.0	500~7,000
1.2	400~6,000
1.5	200~3,000
2.0	100~2,000

付録 4　マイクロピペットの使い方

マイクロピペットは、微量の液体を正確に測り取るための器具です。使用方法はメーカーによって多少異なります。ここでは最も一般的なものについて説明します。

1) 目盛りを見ながら、数値が測り取りたい量になるまでダイアルを回してください。目盛りは、200 µl 用の場合は上から百の位、十の位、一の位、20µl 用の場合は十の位、一の位、1/10 の位になっています。例えば図のような目盛りの場合、200 µl 用だと 85 µl、20 µl 用だと 8.5 µl を示していることになります。
   シャフトには軽い力で押し込める 1 段階目と、強い力で押し込める 2 段階目があるので、まずはそれを確認してください。試薬を取る際は 1 段階目で止めます。2 段階目まで押し込んでしまうと、設定した容量よりも多くの液体を吸ってしまいます。
2) マイクロピペットの先端をチップの口に押し込み、しっかりとチップをはめてください。これで準備は完了です。
3) シャフトを 1 段階目まで押し込んだ状態で、チップの先端を溶液中に入れてゆっくりとシャフトを上げると、チップ中に溶液が入っていきます。
   ※ここで一気にシャフトが上がると、チップ中に空気が入りやすくなりますので注意してください。
4) 溶液を吸ったチップの先端を新しいチューブに入れてシャフトを押し込むと、溶液をはき出せます。このとき溶液を完全にはき出すために、シャフトを 2 段階目まで押し込んでください。シャフトを押したままチップの先を液体から出します。
5) 使用済みのチップをマイクロピペットから外して捨ててください。溶液の混入をふせぐため、異なる溶液を取る際は必ずチップを交換してください。

付録 5　DNA 観察の推奨方法

泳動槽からゲルを取り出し、青色 LED ライト（ブラックライト、紫外線でも可能）の光を当てます。ライトを当てている上から蛍光観察フィルム（黄色、セロファンでかまいません）をかぶせ、フィルムの上から観察します。

付録 6　制限酵素について

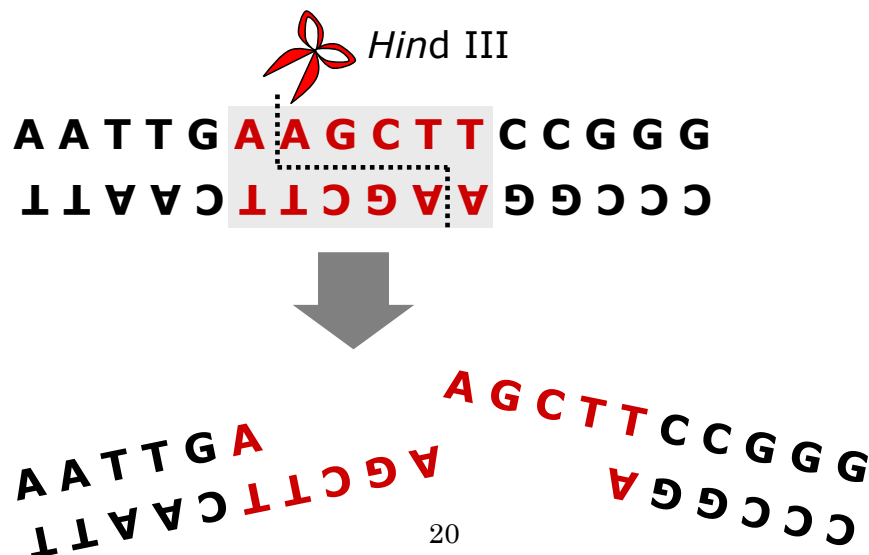
細菌から発見された制限酵素

　制限酵素は最初、大腸菌から発見されました。細菌にはウイルス（ファージ）に感染されたときに、ファージの増殖を抑える（制限する）働きがあります。そこで働く酵素として見つかったため、「制限酵素」という名前がつけられました。大腸菌は、侵入者のDNAを切断・分解することで自らの身を守っていたのです。その後の研究により、制限酵素は大腸菌以外にも多くの細菌が持っていることが分かり、さまざまな DNA 配列を認識するものが発見されています。

　本キットでは、 *Haemophilus influenzae* Rd.が持っている制限酵素 *Hin*d III を用いてラムダ・ファージ由来の DNA の配列を切断します。

制限酵素の性質

　制限酵素は、特定の DNA の配列を認識し切断する酵素です。大部分の制限酵素は 4 塩基、6 塩基または 8 塩基の、特定の DNA の配列を認識し、切断します。

　制限酵素の大きな特徴は、その認識する DNA の配列がパリンドローム（回文）構造をとっていることです。パリンドローム構造とは、「シンブンシ（新聞紙）」のように前から読んでも後ろから読んでも同じことを指しますが、2 本鎖の DNA におけるパリンドローム構造とは下図のような配列（灰色四角）を指します。制限酵素 *Hin*d III は下図のパリンドローム配列（赤字）を認識して特定の箇所（点線の部分）で切断します。

免責事項

本製品は、バイオ教育を目的として開発されたキットです。本取扱説明書に記載された手順以外でのご使用につき発生したいかなる損害に関して、当社は一切の責任を負いません。

商品のご返品について

商品のご返品につきましては、弊社の確認を必要とさせていただきます。この確認なしでのご返品はご遠慮ください。適切な保存、ご使用をされていない製品についてはご返品をお受けできない場合がございます。また、品質保持のために返品された製品を再販することは一切ございません。

アフターサポート 『バイオレスキュー』

ご購入後 3 ヶ月間(ご購入月を含む)無料でご利用いただける、アフターサポートサービスです。大学や研究機関等でバイオの研究に携わる、若手研究者が実験手順や先端科学に関する知識面のサポートをいたします。

サポートを担当するのは、リバネスが実施する先端科学実験教室のノウハウを持つスタッフでもありますので、授業内で行う実験カリキュラム等に関するご相談も承っております。気軽にご利用いただけるサービスですので、少しでもご不明な点がございましたらぜひご利用下さい。

Feel so Science シリーズ　カスタマーサポート係

TEL:03-6277-8041

FAX:03-6277-8042

Mail:ed-kit@leaveanest.com

製造・販売元

お問い合せ先

〒160-0004
東京都新宿区四谷 2-11-6 VARCA 四谷 10 階
TEL 03-6277-8041
FAX 03-6277-8042
URL:http://www.leaveanest.com/